

Determinação de Betacaroteno e Licopeno em Frutas e Hortaliças por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (Clae)



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2015

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Semiárido

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 126

Determinação de Betacaroteno e Licopeno em Frutas e Hortaliças por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae)

Luiz Claudio Corrêa

Rita de Cássia Souza Dias

Rita de Cássia Rodrigues de Souza

Silvana Souza Martins

Paula Tereza de Souza e Silva

Embrapa Semiárido

Petrolina, PE

2015

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Alessandra Monteiro Salviano

Diana Signor Deon

Fernanda Muniz Bez Birolo

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Maria Pinto

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Rafaela Priscila Antonio

Roseli Freire de Melo

Salete Alves de Moraes

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva

Foto da capa: Rita de Cássia Souza Dias

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2015): Formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semiárido

Determinação de betacaroteno e licopeno em frutas e hortaliças por cromatografia líquida de alta eficiência (Clae) / Luiz Claudio Corrêa... [et al.]. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015.

17 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 126).

1. Análise química. 2. Cenoura. Manga. 4. Melancia. 5. Composto químico. I. Corrêa, Luiz Claudio. II. Dias, Rita de Cássia Souza. III. Souza, Rita de Cássia Rodrigues de. IV. Martins, Silvana Souza. V. Silva, Paula Tereza de Souza e. VI. Título. VII. Série.

CDD 544.92

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	13
Conclusões	24
Referências	25

Determinação de Betacaroteno e Licopeno em Frutas e Hortaliças por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae)

Luiz Claudio Corrêa¹; Rita de Cássia Souza Dias²; Rita de Cássia Rodrigues de Souza³; Silvana Souza Martins⁴; Paula Tereza de Souza e Silva⁵

Resumo

O objetivo desse estudo foi quantificar betacaroteno e licopeno em diferentes matrizes vegetais por cromatografia líquida. Os carotenoides foram identificados e quantificados por Clae. A metodologia foi validada avaliando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. A seletividade foi confirmada por meio dos tempos de retenção e dos espectros de absorção dos padrões de betacaroteno e licopeno. A linearidade foi confirmada por meio do R^2 de 0,999 para os dois compostos. Os limites de detecção e quantificação para o licopeno foram de 0,07 mg.L⁻¹ e 0,22 mg.L⁻¹, respectivamente, e para o betacaroteno, de 0,01 mg.L⁻¹ e 0,05 mg.L⁻¹. A repetibilidade variou de 0,75 a 1,27 (CV %) e de 0,80 a 1,64 (CV %) para licopeno e betacaroteno, respectivamente. A precisão intermediária variou de 2,26 a 3,12 (CV %) para o licopeno e 3,91 a 4,03 (CV %) para o betacaroteno. O método apresentou boa exatidão para os dois compostos (105%). Os teores de betacaroteno encontrados

¹Biólogo, D.Sc. em Botânica, analista da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Genética e Melhoramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Engenheira Química, D.Sc. em Química, professora da Univasf, Petrolina, PE.

⁴Bióloga, M.Sc. em Horticultura Irrigada, supervisora do Laboratório de Análises de alimentos, bebidas, água e efluentes do Senai, Petrolina, PE.

⁵Química, D.Sc. em Química, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

em cenoura e manga in natura foram, respectivamente de 3,70 mg 100g⁻¹, 0,84 mg 100g⁻¹. Amostras de melancia apresentaram teores de betacaroteno variando entre 0,10 mg.L⁻¹ e 0,60 mg 100g⁻¹, enquanto o licopeno variou de 29,30 mg 100g⁻¹ a 44,40 mg 100g⁻¹.

Termos para indexação: carotenoides, Clae, validação.

Determination of Carotene and Lycopene in Fruits and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Abstract

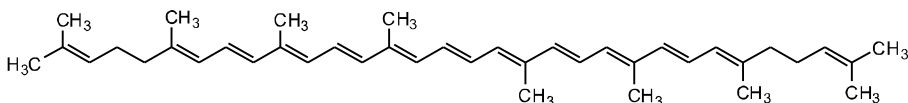
The aim of the present study was to quantify beta-carotene and lycopene in different vegetables using liquid chromatography. The carotenoids were identified and quantified via HPLC. The method was validated by assessing the parameters of selectivity, linearity, accuracy and precision, as well as the limits of detection and quantification. Selectivity was confirmed through retention times and the absorption spectra patterns of beta-carotene and lycopene. The linearity was confirmed by R^2 , which was 0.999 for both compounds. The detection and quantification limits for lycopene were 0.07 and 0.22 mg.L⁻¹, respectively. For beta-carotene, these limits were 0.01 and 0.05 mg.L⁻¹, respectively. Repeatability varied from 0.75 to 1.27 (CV %) and from 0.8 to 1.64 (CV %) for lycopene and beta-carotene, respectively. The intermediate precision ranged from 2.26 to 3.12 (CV %) for lycopene and from 3.91 to 4.03 (CV %) for beta-carotene. This method exhibited satisfactory accuracy for the two compounds (approximately 105%). Beta-carotene levels found in carrots and mango in natura were 3.70 mg 100g⁻¹ and 0.84 mg 100g⁻¹, respectively. Watermelon samples contained beta-carotene between 0.10 and 0.60 mg 100g⁻¹, while lycopene ranged from 29.30 to 44.40 mg 100g⁻¹.

Index terms: carotenoids, HPLC, validation.

Introdução

O interesse pela quantificação de compostos carotenoides em alimentos tem aumentado nos últimos anos por causa das atividades imunomoduladoras, anticarcinogênicas, de prevenção da degeneração macular e de doenças cardiovasculares (ARTÉS-HERNÁNDEZ et al., 2010). A principal propriedade desses compostos em prevenir doenças é sua atividade antioxidante (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

Os carotenoides são encontrados em algumas plantas e representam um grupo de pigmentos que são frequentemente responsáveis pela cor vermelha, laranja e amarela das frutas e vegetais (GARBANZO et al., 2011). Sua estrutura química é caracterizada pela presença de hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas extremidades da molécula. Na natureza, existem mais de 600 pigmentos carotenoides, destacando-se o licopeno e o betacaroteno (Figuras 1 e 2).

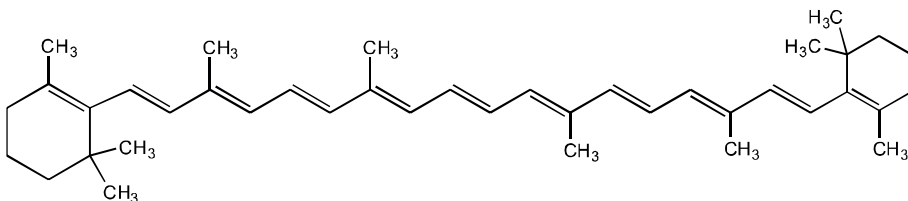


Licopeno

Fórmula química: C₄₀H₅₆

Massa molecular: 536,87

Figura 1. Estrutura química do licopeno.



βCaroteno

Fórmula química: C₄₀H₅₆

Massa molecular: 536,87

Figura 2. Estrutura química do betacaroteno.

O licopeno é o carotenoide responsável pela coloração vermelha do tomate, sendo encontrado em melancia, goiaba, mamão, pitanga e outros alimentos (MORITZ; TRAMONTE, 2006). Apresenta uma estrutura química com fórmula molecular $C_{40}H_{56}$ e massa molecular de 536,87 g mol⁻¹. Essa molécula é capaz de reduzir os riscos de alguns tipos de câncer por capturar radicais livres relacionados com danos no DNA que podem levar ao desenvolvimento de tumores (PERKINS-VEAZIE; COLLINS, 2004). Sua ingestão tem sido relacionada com a proteção contra o câncer de próstata e a redução de riscos de doenças cardiovasculares, principalmente por estar relacionada com a redução dos níveis de LDL no sangue (CHEN et al., 2001; SESSO et al., 2003). A elevada capacidade antioxidante observada nesta molécula se deve à presença de grande número de ligações dieno conjugadas, o que a torna extremamente eficaz na absorção de oxigênio singlete (SILVA et al., 2010).

O betacaroteno é um carotenoide presente em vegetais e frutas de cor amarelo-laranja, destacando-se cenoura, abóbora, mamão, manga, melancia, bem como em vegetais folhosos de cor verde-escuro, como a couve. Os teores mais elevados desse carotenoide, que apresenta consideráveis atividade pró-vitamina A, têm sido encontrados em frutas cuja polpa apresenta coloração alaranjada (TADMOR et al., 2005). Estudos indicam que dietas ricas nesse carotenoide estão relacionadas a menores índices de doenças coronarianas (BELLIZI et al., 1994) e à proteção da pele contra a radiação UV (MARINOVA; RIBAVORA, 2007; SANTOCONO et al., 2007). Além disso, sua baixa ingestão está associada à degeneração macular (SILVA et al., 2010). Betacaroteno e licopeno apresentam a mesma fórmula molecular, diferindo apenas na conformação química (Figura 2).

A quantificação desses carotenoides tem sido realizada principalmente por métodos espectrofotométricos (DAVIS, et al., 2007; FISH et al., 2002; RODRIGUES, 2013), cujos custos são reduzidos em relação aos métodos cromatográficos. Entretanto, análises espectrofotométricas são realizadas sem a acurácia propiciada pela cromatografia, em que a separação entre os compostos, promovida por sua afinidade diferencial com a fase estacionária, permite a quantificação mais precisa dos diferentes tipos de moléculas. Uma vez que o perfil de compostos de

uma determinada classe apresenta grande variação em função da matriz estudada, o desenvolvimento de métodos voltados para análises em matrizes específicas pode otimizar os procedimentos, com significativa melhora na qualidade dos resultados.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a quantificação de betacaroteno e licopeno em cenoura, manga e melancia por Clae, utilizando-se detector por arranjo de diodos (DAD).

Material e Métodos

Foram utilizados padrões de betacaroteno e licopeno, com pureza > 90%, para o preparo de soluções estoque a 1.000 mg.L⁻¹ em clorofórmio. Para a composição da fase móvel, foram utilizados acetonitrila, acetato de etila e metanol, todos grau HPLC.

Foram analisadas amostras de cenoura in natura e com revestimento comestível antimicrobiano, manga 'Tommy Atkins' in natura e liofilizada e melancia 'Crimson Sweet', 'Embrapa 1' e 'Embrapa 2' (melancia melhorada geneticamente), empregando-se duas metodologias de extração; uma para o betacaroteno em cenoura e manga e outra para o licopeno e betacaroteno em melancia. As amostras estudadas foram provenientes de projetos da Embrapa e de projetos junto ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (Senai).

A metodologia utilizada para a extração do betacaroteno foi baseada no descrito por Nagata et al. (2008) com modificações. Amostras de minicenoura ou manga foram trituradas em liquidificador e pesadas (5 g), com posterior adição de 20 mL de acetato de etila. Após a homogeneização por 5 minutos em homogenizador a 18.000 rpm, o extrato foi transferido para balão, sendo o resíduo lavado com 20 mL de acetato de etila, posteriormente transferidos para o mesmo balão. O procedimento foi repetido por cinco vezes, garantindo a remoção total de pigmentos da amostra. Em seguida, o extrato foi rotaevaporado até a total remoção do solvente, ressuspensionado em 10 mL da fase móvel (metanol: acetato de etila: acetonitrila /80:10:10, v:v:v), filtrado em membrana de 0,45 µm e colocado em vial âmbar para análise por Clae-DAD.

Betacaroteno e licopeno foram extraídos com base no procedimento descrito por Nagata e Yamashita (1992) com modificações. Amostras de melancia foram trituradas em liquidificador e pesadas (5 g). Após adição de 20 mL da mistura hexano/acetona (6:4), procedeu-se a homogeneização por 5 minutos em homogeneizador a 18.000 rpm. O extrato foi transferido para erlenmeyer de 250 mL e o resíduo lavado cinco vezes, com porções de 20 mL da mistura extratora, até a perda total da pigmentação, sendo as frações adicionadas ao erlenmeyer. Após esta etapa, foram adicionados ao extrato, 10 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4). O líquido foi então filtrado e recolhido em balão de 250 mL de fundo redondo. O extrato foi levado para um evaporador rotativo até a secura e ressuspendido em 10 mL da fase móvel (metanol: acetato de etila: acetonitrila /80:10:10, v:v:v), sendo então filtrado em membrana de 0,45 μm e colocado no vial âmbar para análise por Clae.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector DAD, nos comprimentos de onda de 450 nm e 470 nm, respectivamente para betacaroteno e licopeno. Para a separação, foi empregada uma coluna Luna C18 150 x 4,6 mm e partículas de 3 μm . Como fase móvel, foi utilizada a mistura metanol, acetonitrila e acetato de etila (80:10:10), com fluxo de 1,2 mL min^{-1} e 15 minutos de corrida. A temperatura do forno foi de 40 °C e o volume de injeção, de 10 μL .

Foram preparadas soluções estoque a 1.000 mg.L^{-1} em clorofórmio, a partir das quais se procedeu o preparo de soluções diluídas em oito níveis de concentração, variando de 0,50 mg.L^{-1} a 75 mg.L^{-1} para o licopeno e de 0,15 a 20 mg.L^{-1} para o betacaroteno, utilizando-se como solvente a fase móvel.

Para a validação do método, foram analisados os seguintes parâmetros:

1) Seletividade – Foi avaliada por meio dos tempos de retenção dos padrões, sendo confirmada por comparação com amostras fortificadas com os padrões nas concentrações de 1,25 mg.L^{-1} e 2,50 mg.L^{-1} , para o betacaroteno, e de 5 mg.L^{-1} e 10 mg.L^{-1} , para licopeno em amostras de melancia.

2) Linearidade – Foi avaliada pela capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação. A linearidade foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2) das curvas de calibração com sete pontos, construídas de acordo com as concentrações esperadas dos açúcares nas amostras. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por meio de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação foi de 0,999 (RIBANI et al., 2004).

3) Limites de detecção e quantificação – Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados para cada composto pelas equações $LD = 3s/m$ e $LQ = 10s/m$, respectivamente, onde s é o desvio padrão das áreas dos padrões de concentrações 0,15 mg.L⁻¹ para o betacaroteno e 0,50 mg.L⁻¹ para o licopeno, injetados sete vezes, e m é o coeficiente angular da curva de calibração (HARRIS, 2008).

4) Exatidão – A exatidão foi determinada com os valores obtidos no teste de adição do analito, realizado em triplicata para as amostras, com os padrões em três níveis de concentrações: 0,25 mg.L⁻¹, 1,25 mg.L⁻¹ e 5,0 mg.L⁻¹ para o betacaroteno e 1,25 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹ para licopeno em amostras de melancia.

5) Precisão – Para a determinação da precisão, foram realizados ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6) Repetibilidade – A repetibilidade foi avaliada por meio da injeção em triplicata de amostras puras e fortificadas com os padrões nas concentrações de 0,5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ para o betacaroteno e de 5 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹ para licopeno, sendo expressa como coeficiente de variação (%).

7) Precisão intermediária – Para a verificação deste parâmetro, foram utilizadas as mesmas amostras já citadas na avaliação da repetibilidade, as quais foram injetadas em triplicata a cada 2 dias, perfazendo um total de 12 injeções para cada amostra. A precisão intermediária foi expressa como coeficiente de variação (%).

Resultados e Discussão

As condições do método permitiram a separação dois compostos na mistura das soluções padrões e nas amostras analisadas (Figura 3). A injeção de amostras fortificadas confirmou a seletividade para os dois compostos nas matrizes analisadas.

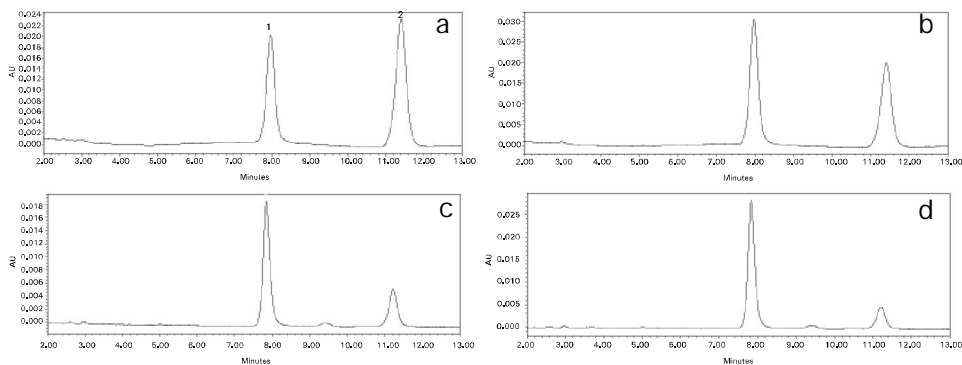


Figura 3. Cromatogramas: padrões de betacaroteno 5 mg.l⁻¹ e licopeno 20 mg.l⁻¹ a 450 nm (1a) e 470 nm (1b) e para amostra de melancia a 450 nm (1c) e 470 nm (1d). Pico 1: licopeno; Pico 2: betacaroteno.

Os coeficientes de determinação (R²) acima de 0,999 confirmaram a linearidade do método para os dois compostos nas faixas de concentração estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Faixa linear, coeficiente de determinação e limites de detecção e quantificação para o método.

Padrão	Concentração (mg.L ⁻¹)	R ²	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Licopeno	0,50 - 75,00	0,9995	0,066	0,221
Betacaroteno	0,15 - 20,00	0,9996	0,014	0,046

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação.

Os limites de detecção e quantificação do método desenvolvido atenderam os teores de betacaroteno e licopeno das frutas e hortaliças analisadas nesse estudo, sendo possível quantificar os compostos em todas as amostras (Tabela 1).

A exatidão foi verificada por meio dos percentuais de recuperação das soluções dos padrões nas matrizes estudadas, que variou de 104,9% a 106,4% (Tabela 2). Esses valores estão de acordo com os observados na literatura, entre 80-120% (RIBANI et al., 2004).

Tabela 2. Exatidão e precisão do método de quantificação de licopeno e betacaroteno em melancia por cromatografia líquida de alta eficiência (Clae).

Composto	Exatidão (%)	Repetibilidade (CV%)	Precisão Intermediária (CV%)
Licopeno	104,9± 5,4	0,93 (0,75-1,27)	2,83 (2,26-3,12)
Betacaroteno	106,4± 3,7	1,14 (0,80-1,64)	3,96 (3,91-4,03)

A repetibilidade ficou muito próxima para os dois compostos, variando de 0,75 a 1,27 (CV %) para o licopeno e de 0,80 a 1,64 (CV %) para o betacaroteno (Tabela 2). Para a precisão intermediária, os coeficientes de variação se situaram entre 2,26 e 4,03 (CV %). Estes resultados mostram que o método foi preciso para a quantificação dos dois compostos em todas as matrizes analisadas.

Os teores de betacaroteno observados em minicenouras orgânicas e com revestimento comestível foram de 3,7 mg 100 g⁻¹ e 4,2 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Com relação à manga ‘Tommy Atkins’, as amostras in natura apresentaram 0,84 mg 100g⁻¹, enquanto nas amostras liofilizadas, o teor foi de 1,9 mg 100 g⁻¹ (Tabela 3). Nas amostras de melancia, os teores de betacaroteno foram baixos, variando de 0,1 mg 100 g⁻¹ a 0,6 mg 100 g⁻¹, quando comparados com o licopeno, cujos valores ficaram entre 29,3 mg 100 g⁻¹ e 44,4 mg 100 g⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Carotenoides encontrados em minicenoura, manga e melancia.

Amostras	Betacaroteno (mg 100g ⁻¹)	Licopeno (mg 100g ⁻¹)
Minicenouras orgânicas in natura	3,7	n. d *
Minicenouras com revestimento comestível antimicrobiano	4,2	n. d
Manga Tommy Atkins in natura	0,84	n. d
Manga Tommy Atkins liofilizada	1,9	n. d
Melancia Crimsom Sweet	0,2	29,33
Melancia Embrapa 1	0,1	44,41
Melancia Embrapa 2	0,6	30,19

*. Não detectado.

Conclusões

O método se mostrou eficiente na separação e quantificação de betacaroteno e licopeno nas matrizes vegetais estudadas.

Os parâmetros de validação avaliados evidenciaram que o método é preciso e exato e as curvas de calibração obtidas apresentaram coeficiente de correlação que indicam excelente ajuste dos dados para a curva analítica.

Referências

ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; ROBLES, P. A.; GÓMEZ, P. A.; TOMÁS-CALLEJASA, A.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Low UV-C illumination for keeping overall quality of fresh-cut watermelon. **Postharvest Biology and Technology**, [Melbourne], v. 55, p. 114–120, 2010.

BELLIZI, M. C.; FRANKLIN, M. F.; DUTHIE, G. G.; JAMES, W. P. Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox. **European Journal of Clinical Nutrition**, [Basingstoke], v. 48, n. 11, p. 822-831, 1994.

CHEN, L.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; DUNCAN, C.; SHARIFI, R.; GHOSH, L.; BREEMEN, R. van; ASHTON, D.; BOWEN, P. E. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. **Journal of the National Cancer Institute**, [Rockville Pike], v. 93, p. 1.872-1.879, 2001.

DAVIS, A. R.; COLLINS, J.; FISH, W. W.; TADMOR, Y.; WEBBER JÚNIOR, C. L.; PERKINS-VEAZIE, P. Rapid method for total carotenoid detection in canary yellow-fleshed watermelon. **Journal of Food Science**, [Rockville Pike], v. 72, p. 319-323, 2007.

FISH, W. W.; PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, [Oxford], v. 15, p. 309-317, 2002.

GARBANZO, C. R; PÉREZ, A. M.; CARMONA, J. B. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour, **Journal of Food Research International**, [São José], v. 44, p. 2.377-2.384, 2011.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in *Bulgarian berries*. **Journal of Food Composition and Analysis**, [Amsterdam], v. 20, n. 5, p. 370-374, 2007.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. Biodisponibilidade de licopeno. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 265-273, 2006.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tokyo, v. 39, n. 10, p. 925-928, 1992.

NAGATA, M.; NOGUCHI, Y.; IMANISHI, S.; SUGIYAMA, K. A simple method for the estimation of alpha- and beta-carotene in carrots. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 768, p. 565-569, 2008.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon. **Postharvest Biology and Technology**, [Amsterdam], v. 31, p. 159-166, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Assessment of the provitamin A contents of foods: the Brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, [Amsterdam], v. 9, p. 196-230, 1996.

RODRIGUES, I, C. N. **Avaliação de parâmetros de qualidade em melancia cultivada na região do Ladoeiro**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar) – Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco.

SANTOCONO, M.; ZURRIAA, M.; BERRETTINIB, M.; FEDELIB, D.; FALCIONI, G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [Amsterdam], v. 88, n. 1, p. 1-10, 2007.

SESSO, H. D.; LIU, S.; GAZIANO, J. M.; BURING, J. E. Dietary lycopene, tomato-based products and cardiovascular disease in women. **The Journal of Nutrition**, Rockville Pike, v. 133, n. 7, p. 2.336-2.341, 2003.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

TADMOR, Y.; KINGB, S.; LEVIC, A.; DAVIS, A.; MEIRA, A.; WASSERMAN, B.; HIRSCHBERG, J.; LEWINSON, E. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 38, p. 837-841, 2005.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 12683